

509,749

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

PCT/CN 2004

(43) 国際公開日
2003年10月23日 (23.10.2003)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/087826 A1

(51) 国際特許分類7:

G01N 33/543, 37/00

(74) 代理人: 渡邊 薫 (WATANABE,Kaoru); 〒105-0014 東京都港区芝3丁目40番4号 シャイン三田ビル5F
天野・渡邊国際特許事務所 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号:

PCT/JP03/03943

(22) 国際出願日:

2003年3月28日 (28.03.2003)

(81) 指定国(国内): AU, CA, CN, KR, SG, US.

(25) 国際出願の言語:

日本語

(84) 指定国(広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, IE, IT, NL, PT, SE).

(26) 国際公開の言語:

日本語

(30) 優先権データ:

特願2002-112934 2002年4月16日 (16.04.2002) JP

添付公開書類:
— 国際調査報告書

(71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 株式会社ナノ・ソリューション(NANO SOLUTION, INC.) [JP/JP]; 〒154-0012 東京都世田谷区駒沢3-7-20 グリーンプラザ2階 Tokyo (JP).

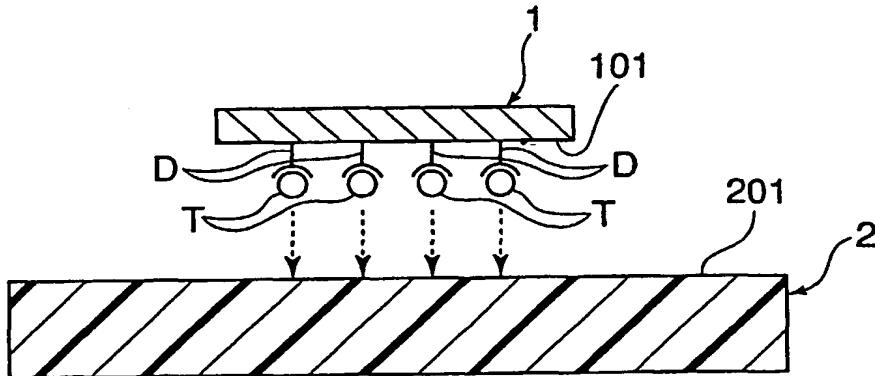
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 夏目徹 (NATSUME,Tohru) [JP/JP]; 〒153-0063 東京都目黒区目黒1-17-21-103 Tokyo (JP).

(54) Title: METHOD OF ANALYZING MOLECULE AND MOLECULE ANALYZER

(54) 発明の名称: 分子解析方法及び分子解析装置



(57) Abstract: A method of analyzing a molecule aiming at facilitating the procedure of analyzing the structure, etc. of a target molecule having been captured by a biosensor and elevating the analysis accuracy, at least involving the molecular transfer step of pressing a target molecule, which interacts with a molecule for detection preliminarily bound to the detection surface of a biosensor (a sensor chip), onto not a liquid phase but a solid phase such as a membrane to thereby transfer it and then collecting the same; and a molecule analyzer which is devised so as to automatically carry out the above method.

(57) 要約: バイオセンサー装置で捕捉された標的分子の構造等を解析する作業の容易化と解析精度向上することからなり、分子間の相互反応を分析するバイオセンサー装置の(センサーチップの)検出表面に予め結合された検出用分子と相互反応を示した標的分子を、液相ではなく、膜体等の固相に圧着等して転写し、回収する分子転写手順を少なくとも含む分子解析方法及び該分子解析方法を自動的に実施できるように工夫された分子解析装置を提供する。

WO 03/087826 A1

明細書

分子解析方法及び分子解析装置

技術分野

本発明は、生化学分野、分子生物学分野等で有用な分析技術に関する。詳しくは、バイオセンサー装置のセンサーチップ上の検出表面部位に予め固相化された「検出用分子」と相互反応を示す「標的分子」の配列や構造等を解析するために特に有用な分子解析技術に関する。

背景技術

現在、検出表面部位を備えるセンサーチップが組み込まれたバイオセンサー装置と称される分析装置が普及している。

このバイオセンサー装置は、現在、アミノ酸、ペプチド、タンパク質、ヌクレオチド、低分子化合物、脂質等の分子間相互反応、例えば、抗原抗体反応、ハイブリダイゼーション、酵素応答反応の分析やそれらのカイネティクス解析等に有用なツールとなっている。

ここで、前記センサーチップの検出表面部位は、検出用分子を固定化するために適する官能基（例えば、カルボキシル基、アミノ基、アルデヒド基、チオール基等）を有する物質やストレプトアビジン等が予め固相化処理されている。

この検出表面に結合することにより固定化された検出用分子は、検出表面上に送液されてくる試料溶液中に標的分子が存在すれば、特異的な相互反応を示して前記標的分子を捕捉することになる。

バイオセンサーは、この相互反応の結合・解離状態を、表面プラズモン共鳴原理や水晶発振子原理等の原理を用いて、リアルタイムに検出する。

検出表面において相互反応を行った後は、検出用分子に捕捉された標的分子を極少容量の所定溶液で回収し、さらに詳細な分子解析（例えば、質量分析法）を行う方法が近年考案されている。該方法では、

捕捉された標的分子を回収して質量分析法にかけるための（標的分子を含む）試料液を作製することになる。

バイオセンサー装置に続く、質量分析計等を用いた分子解析の精度は、前記試料液中の試料濃度に大きく依存することから、できるだけ微量の回収液によって前記標的分子を回収することが重要である。

しかし、極微量の回収液の調整及び送液作業には高度な熟練技術が必要であった。また、この溶液による回収作業は時間がかかることから、これをハイスループット化して作業効率を高めるための改良が試みられているが、限界があるという解決困難な技術的課題があった。

そこで、本発明は、センサーチップの検出表面に捕捉された標的分子を膜体に転写して回収する技術を提供するとともに、この技術を用いた分子解析方法及び分子解析装置を提供することを目的とする。

発明の開示

上記技術的課題を解決するために、本願では、分子間の相互反応を分析するバイオセンサー装置の検出表面に結合された検出分子と相互反応を示した標的分子を固相に転写する分子転写手順を少なくとも含むように工夫された分子解析方法を提供する。

具体的には、バイオセンサー装置のセンサーチップに形成された検出表面での分子間相互反応終了後に、センサユニット部から検出表面部分を取り外し、所定の固相に対して転写する。

ここで、「転写」は、検出表面に捕捉されていた分子を転写体である固相に移行させる手順又は写し取る手順を広く意味し、狭く解釈されない。分子転写手順としては、電気的転写、圧着転写、吸引転写の中から選択される一の手順を採用でき、これらの手順を適宜組み合わせてもよい。

「検出表面」とは、例えば、プラズモン共鳴原理又は水晶発振子原理によって相互反応検出を行うセンサユニット部に配置されるセンサーチップに設けられた、分子間相互反応が可能な処理が施された表面領域である。本発明に係る方法の実施に際しては、センサユニッ

ト部において、センサーチップができるだけ簡易に脱着できる構成となっていることが望ましい。

本発明に係る分子解析方法は、検出表面に捕捉された分子を液相中に回収するという従来の極めて一般化した発想から大きく転換した技術的思想を有し、バイオセンサー装置のチップの検出表面に捕捉された標的分子を、固相、とりわけ膜体に転写することによって回収するという全く新規な分子回収技術を提供することを主題としている。

「固相」は、検出表面に捕捉された標的分子を受け取って保持できる性質を少なくとも備えている固体、半固体が含まれる。

「膜体」は、液体透過性を有する多孔体であって、例えば、ポリビニルアルコール（PVA）膜、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、メンブレンフィルターを挙げることができる。

転写対象の固相として膜体が適する理由は、柔軟性を有するので検出表面を密着させ易く、液体透過性を備えるので、洗浄等の後処理を好適に行うことができるからである。

上記した分子転写手順を採用すれば、初心者でも簡単に、検出表面に捕捉された標的分子を汚れを混入させることなく回収でき、分子回収作業に要する時間も、大幅に短縮できる。また、手間のかかる回収用カラムの作製作業も不要となる。

そして、溶液による検出用分子の回収作業を行う必要がないため、流路系に存在する汚れが微量な試料溶液中に混入し、分析の障害になるという従来の液相回収法が抱えていた問題を根本的に解決できる。

更に、近年、センサーチップの検出表面を区分けして、複数種の検出用分子を別々に固定化し、それぞれの検出用分子と相互反応を示す標的分子を検出、分析するという技術が試みられる場合がある。

この場合において、本発明の分子転写手順を採用すれば、確実に複数種の標的分子を混合することなく別々に、かつ同時に転写回収し、解析することができるようになるという利点がある。

具体的には、従来の溶液による回収手順では、検出表面上の各検出用分子に捕捉された標的分子の回収作業を、区分けされた流路系を用

いて、順次、別個独立の作業の下で行わなければならなかつたので、非常に手間と時間がかかっていた。また、長時間に及ぶ回収作業の間に、標的分子が解離したり、変性したりしてしまうことがあつた。

一方、本発明における分子転写手順は、検出表面に捕捉された複数種の標的分子を、一度に転写し回収できるので、手間がかからず、回収作業を短時間で終了できる。また、回収作業に時間がかかるないの^で標的分子の解離や変性の問題も発生しない。

ここに、本発明に係る分子解析方法の一連の手順の具体例を示せば、分子間の相互反応を分析するバイオセンサー装置の検出表面に対して標的分子を含有する溶液を接触させ、続いて、該検出表面に捕捉された標的分子（検出用分子とアクティブに反応した標的分子）を膜体に転写し、この膜体に転写された標的分子を、例えば、酵素消化等を用いて液相中に溶出させた後に、試料液を質量分析法によって解析するという手順を挙げることができる。

なお、質量分析法では、標的分子の分子種を同定したり、構造解析を行ったりすることができる。例えば、標的分子がタンパク質である場合には、アミノ酸配列、リン酸化の状態、糖質の付加状態等を解析し、標的分子が脂質である場合には、側鎖長の解析等を行うことができる。

次に本発明では、上記分子解析方法に加えて、分子間の相互反応を分析するバイオセンサー装置の検出表面に結合された検出分子と相互反応を示した標的分子を膜体に自動的に転写できるように工夫された自動分子転写手段を少なくとも備える分子解析装置を提供する。

即ち、検出表面での相互反応手順完了後に、バイオセンサー装置からセンサーチップ（又は検出表面部位）を取り出し、該センサーチップ（又は検出表面部位）を所定箇所に設置し、続いて、電気的転写、圧着転写、吸引転写の中から選ばれる一の手段によって、予めセンサーチップと対向する位置に設置されている膜体等の固相に対して検出用分子が自動的に転写されるようとする。

なお、本装置には、転写手段に加えて、後続の分析に有用な洗浄、修飾化、酵素消化、抽出等の手順を自動的に実行できる手段を設けてもよい。

以上のように、本発明に係る分子解析方法又は分子解析装置は、バイオセンサー装置の検出表面に捕捉された分子を固相に回収することによって、作業効率を向上させるとともに、後続の分子解析精度を高めることができるという技術的意義を有している。

図面の簡単な説明

第1図は、本発明に係る分子解析方法の分子転写手順及び分子解析装置の分子転写手段の概念を簡略に表す図である。

第2図は、分子転写作業後の膜体(2)の状態を簡略に示す図である。

第3図は、本発明に係る分子解析装置の基本概念を簡略に示すプロック図である。

第4図は、表面プラズモン共鳴による実時間反応曲線を示す図(グラフ)である。

第5図は、膜体への転写状態を示す図(写真)である。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明に係る分子解析方法及び分子解析装置の好適な実施形態について、添付図面を参照しながら説明する。

まず、第1図は、本発明に係る分子解析方法の分子転写手順及び分子解析装置の分子転写手段の概念を簡略に表す図である。

第1図中における符号1は、バイオセンサー装置を用いた分子間相互反応後に、該装置のセンサユニット部から取り外されたセンサーチップの検出表面を表している。

この検出表面1の反応面101には、予め検出用分子Dが固定化されており、分子間相互反応によって該検出用分子Dには、該分子Dとアクティブに相互反応を示した標的分子Tが結合している。なお、本

発明において、バイオセンサー装置の種類や検出表面の構成は、適宜選択可能であって、狭く限定されることはない。

第1図中における符号2は、PVA膜、ナイロン膜、ニトロセルロース膜、メンブレンフィルター等の膜体を示している。この膜体2に対して、前記検出表面1の反応面101を対向させて、その後、前記反応面101と膜体2の転写面201を接触させた状態を確保し、続いて、検出表面1に電気を印加したり、検出表面1を転写面201に向けて押し付けて圧着させたり、真空吸引等の吸引力を利用したり等して、検出表面1の反応面101から膜体2の転写面201へ標的分子Tを移行させる（分子転写手順）。

第2図は、分子転写作業後の膜体2の状態を簡略に示す図である。この第2図に示されるように、分子転写作業完了後には、検出表面1から膜体2の転写面201へ標的分子Tが移行し、該標的分子Tが転写面201に付着した状態となる。即ち、固相中に検出用分子Dと相互反応を示した標的分子Tが確実に固相中に回収される。

なお、検出表面1に複数種の標的分子T₁, T₂, T₃, T₄が捕捉されている場合では、これらの標的分子T₁～T₄が、一度の分子転写作業で、膜体2の転写面201に転写されることになる。

なお、膜体2には、標的分子Tに加えて、検出用分子Dも同時に転写される場合があるが、この場合、後続の分析により、両者を区別することが可能があるので、標的分子Tの構造等の解析には問題がない。

膜体2に転写回収された標的分子は、後続の分析方法に応じて、必要な洗浄、修飾化、酵素消化、抽出等の処理が施され、その分子種の同定や構造解析等が行われる。

次に、添付した第3図に基づき、本発明に係る分子解析装置の構成を説明する。第3図は、本発明に係る分子解析装置の基本概念を簡略に示すブロック図である。

第3図中の符号3は、バイオセンサー装置の一例である表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance : SPR）原理を用いたバイオ

センサー装置の要部構成を簡略に示しており、このバイオセンサー装置3には、符号Uで示されたセンサユニット部が設けられている。

このセンサユニット部Uは、表面プラズモンが金属／液体界面で励起した場合に起こる表面プラズモン共鳴を光学的に検出するS P R 検出手段301を備える。

S P R 検出手段301は、検出用分子と標的分子の結合と解離に伴って、センサーチップの検出表面で生じる微妙な質量変化をS P R シグナルとして検出する。

また、センサユニット部Uは、一般に、検出表面1に対して正確な送液の制御を行うマイクロ流路系302と、センサーチップ303と、を備えている。

センサーチップ303の所定箇所には検出表面1が形成されている。該検出表面1は、例えば、ガラス基板に金の薄膜が蒸着された構成を備え、この金薄膜側に固定化された検出用分子Dと、前記マイクロ流路系によって制御されて送液されてくる溶液中に含まれる標的分子Tの相互反応の場を提供する。

なお、センサユニット部Uには、マイクロ流路系302ではなく、キュベット方式が採用される場合がある。

上記構成のバイオセンサー装置3において、分子間(DとT)の相互反応を、所定の手順に従って行った後、該装置3からセンサーチップ303を取り外し、自動分子転写装置4に移送する。

そして、センサーチップ303(又は該センサーチップ303から外した検出表面1)を、自動転写部401の所定の転写箇所401aに設置する。なお、センサーチップ303の転写箇所401aへの設置手順は、自動化してもよい。

前記した転写箇所401aには、予め膜体2が設置されており、前記センサーチップ303は、その検出表面1が、前記膜体2に対向するように設置される。

転写は、電気的転写、圧着転写、吸引転写のいずれかの手段を適宜選択して行えばよい。なお、これらの手順を組み合わせた転写手段を

採用してもよく、例えば、転写箇所 401a を密閉状態として、吸引圧着する手段を採用することができる。

続いて、転写作業終了後、転写箇所 401a から膜体 2 を取り出し、分析サンプル調整部 402 の所定箇所 402a に移送する。転写箇所 401a からの膜体 2 の取り出し並びに分析サンプル調製部 402 への移送の各手順についても、全自動化してもよい。

分析サンプル調製部 402 では、後続の分子解析に適したサンプル S を得るために前処理手順である、洗浄、修飾化、酵素消化、抽出等の手順を適宜に選択できる構成とし、これらの手順を自動的に実施できるようにする。

第3図では、自動転写部 401 と分析サンプル調製部 402 が区分けされた構成を例示している。自動転写部 401 と分析サンプル調整部 402 を一体化し、膜体 2 を移送することなく、自動転写部 401 において転写と前処理手順を連続で行うようにしてもよい。

分析サンプル調整部 402 で前処理されて得られたサンプル S は、質量分析計等の分子分析装置 M にかけられて、当該分子種の同定や当該分子の構造解析が行われる。

<実施例>

本願発明者は、センサーチップの検出表面に捕捉された標的分子が膜体に転写されるか否かの検証実験を行った。

実験条件及び方法。

バイオセンサー装置は、ビアコア社製表面プラズモン共鳴センサ； BIACORE 3000 を使用し、センサーチップは、ビアコア社の CM5 を使用した。

検出用分子として抗グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (Glutathione S-transferase: GST) 抗体をアミンカップリング法にてセンサーチップ表面に固定化した。その後、標的分子である GST をセンサーチップ表面に送液・反応させた。

その間、第4図に示す表面プラズモン共鳴による実時間反応曲線を観察し、十分な結合量が得られたことを確認し、センサーチップをバ

イオセンサー装置から取り外した。取り外したセンサーチップ表面にポリビニルアルコール転写膜（PVA膜）を10分間圧着した。なお、圧着した状態を第5図（写真）に示す。

その転写効率をウェスタンプロット法で評価した。ウェスタンプロット法に用いたのは検出用分子として用いたのと同じ抗GST抗体である。¹⁴予想される。

実験結果と考察。

前記表面プラズモン共鳴による実時間反応曲線から、標的分子は約2ナノグラムがセンサーチップ上に結合したものと思われた。そのセンサーチップ表面にPVA膜を圧着して転写操作を行ったところ、標的分子のシグナルが膜体から極めて有意に検出された。

このことは、センサーチップ上に結合した任意の分が膜体上へ高効率に回収され、質量分析法等によって高感度に結合分子の解析ができるることを意味する。

産業上の利用可能性

本発明に係る分子解析方法又は分子解析装置によれば、初心者でも簡単に、検出表面に捕捉された標的分子を固相に回収できるので、分子回収作業に要する時間を大幅に短縮できるので大変便利である。また、手間のかかる回収用カラムの作製作業も必要がない。加えて、溶液による検出用分子の回収作業を行う必要がないことから、バイオセンサー装置の流路系に存在する汚れが微量な試料溶液中に混入し、分析の障害になることがないので、分子解析精度を向上させることができる。

複数種の検出用分子を別々に固定化し、それぞれの検出用分子と相互反応を示す標的分子を検出、分析する場合では、一度の分子転写手順又は分子転写手段を実行することによって、迅速かつ確実に、複数種の標的分子を転写回収し、解析することができる。

本発明に係る分子解析方法又は分子解析装置は、バイオセンサー装置の検出表面に捕捉された分子を固相に回収するように工夫した結果、

分子解析に係わる作業の効率を大幅に向上させることができるとともに、後続の分子解析精度を高めることができる。

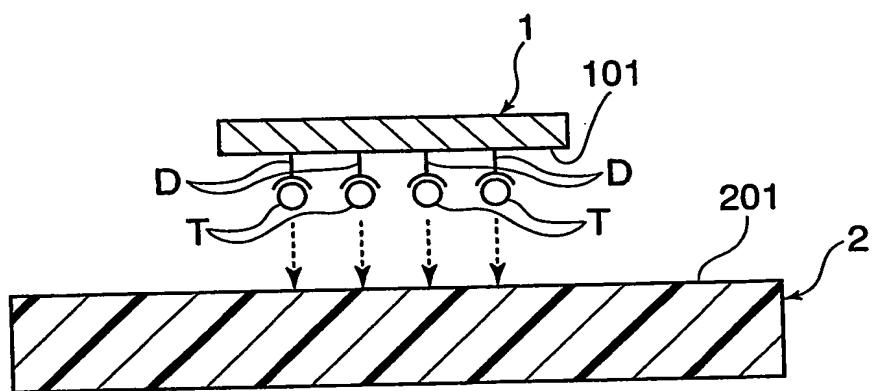
本特許を 基盤として

本特許を 基盤として

請求の範囲

1. 分子間の相互反応を分析するバイオセンサー装置の検出表面に結合された検出分子と相互反応を示した標的分子を、固相に転写する分子転写手順を少なくとも含むことを特徴とする分子解析方法。
2. 前記固相は、膜体であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の分子解析方法。
3. 前記分子転写手順は、少なくとも電気的転写、圧着転写、吸引転写の中から選択される一の手順を含むことを特徴とする請求の範囲第1項又は第2項に記載の分子解析方法。
4. 前記検出表面は、プラズモン共鳴原理又は水晶発振子原理によつて前記相互反応の検出を行うセンサユニット部に配置されている検出表面であることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の分子解析方法。
5. 前記分子転写手順によって膜体上に回収された分子間の相互反応を分析するバイオセンサー装置の検出表面に結合された標的分子を質量分析法により解析する請求の範囲第1項に記載の分子解析方法。
6. 分子間の相互反応を分析するバイオセンサー装置の検出表面に結合された検出分子と相互反応を示した標的分子を固相に自動的に転写する自動分子転写手段を少なくとも備えることを特徴とする分子解析装置。
7. 前記固相は、膜体であることを特徴とする請求の範囲第6項に記載の分子解析装置。
8. 前記分子転写手段は、少なくとも電気的転写、圧着転写、吸引転写の中から選択される一の手段を含むことを特徴とする請求の範囲第6項又は第7項に記載の分子解析装置。

第 1 図

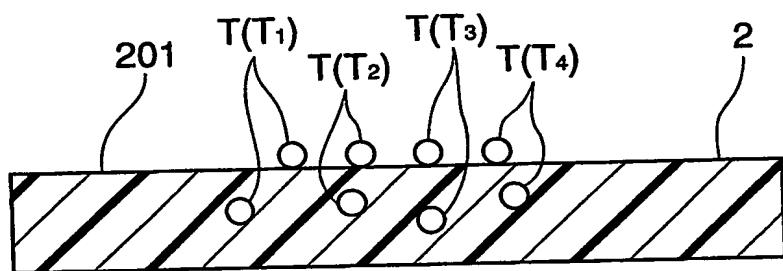


第 2 図

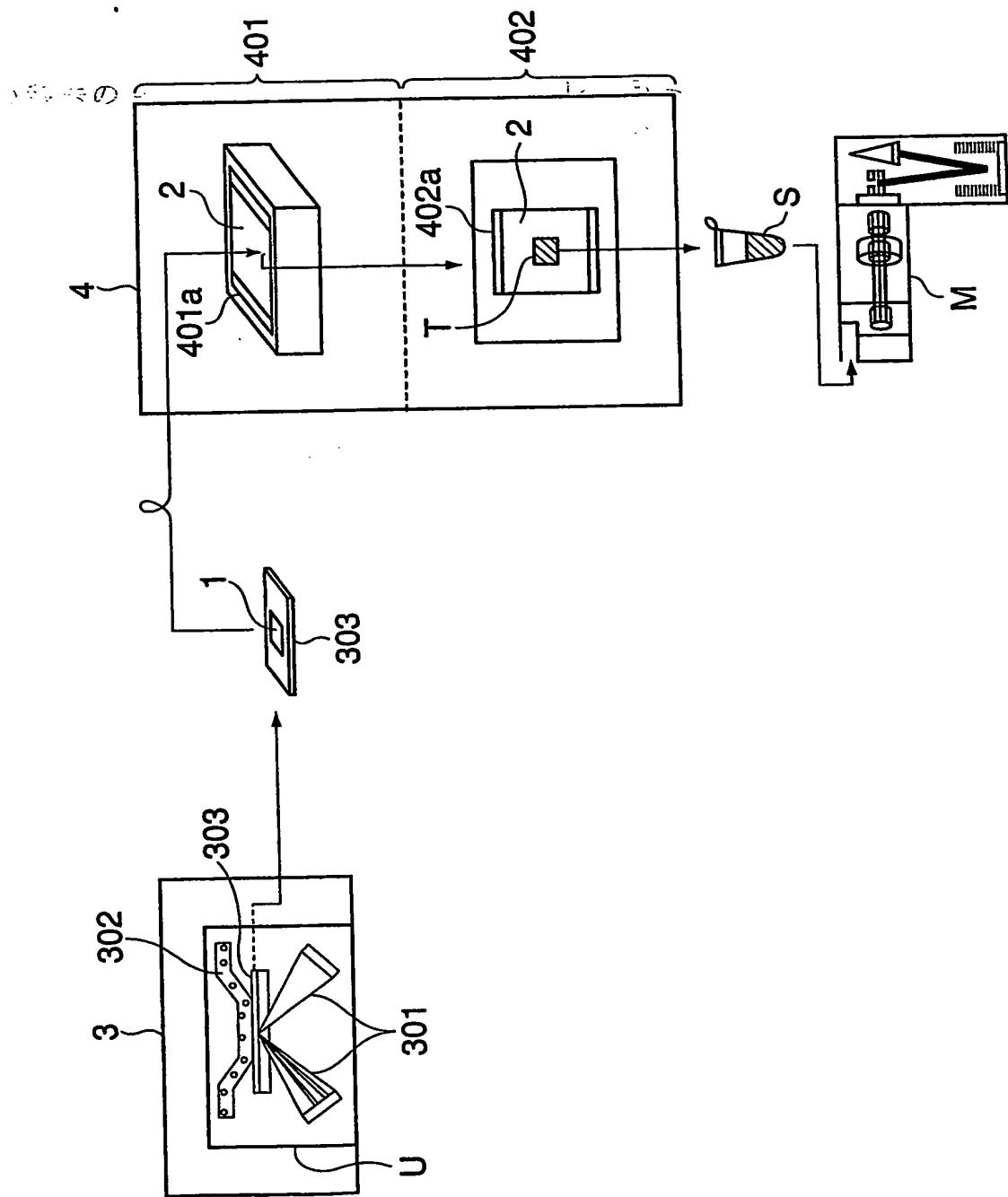
P' 構

等の構成部

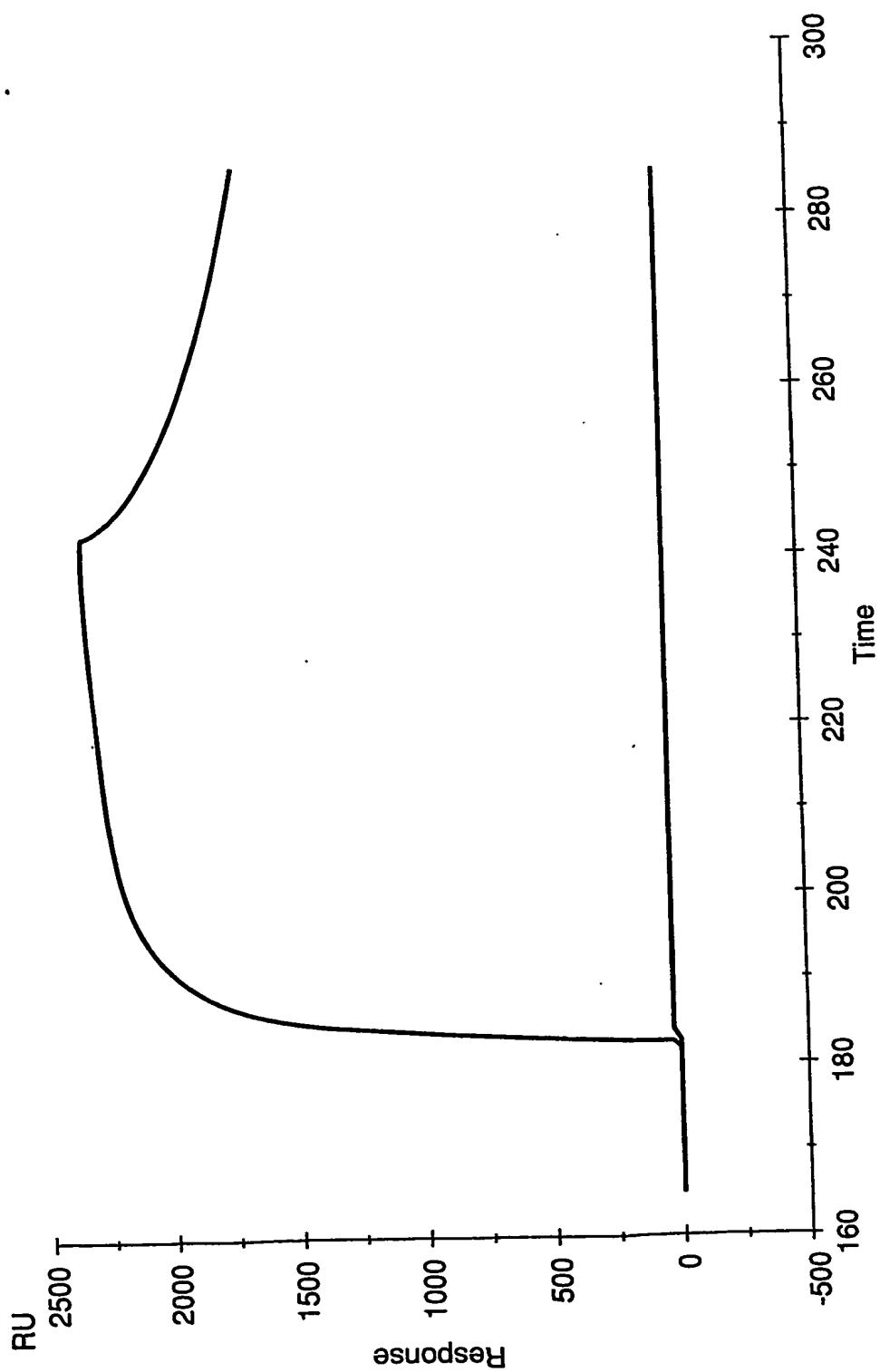
等の構成部



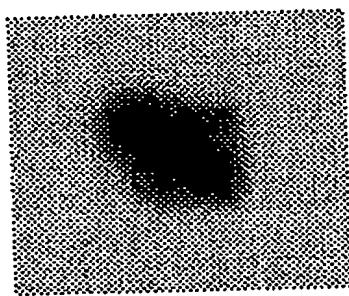
第 3 図



第 4 図



第 5 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03943

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/543, G01N37/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/543, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
 Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003
 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JOIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 9-500208 A (SmithKline Beecham Corp.), 07 January, 1997 (07.01.97), & US 5395587 A & EP 707710 A	1-8
A	JP 9-049830 A (Terumo Corp.), 18 February, 1997 (18.02.97), (Family: none)	1-8

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
---	--

Date of the actual completion of the international search 17 April, 2003 (17.04.03)	Date of mailing of the international search report 30 April, 2003 (30.04.03)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int. C17 G01N33/543, G01N37/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int. C17 G01N33/543, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2003年
日本国登録実用新案公報	1994-2003年
日本国実用新案登録公報	1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JOIS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP 9-500208 A(スマスクライン・ビーチャム・コーポレイション) 1997.01.07 & US 5395587 A & EP 707710 A	1-8
A	JP 9-049830 A(テルモ株式会社) 1997.02.18(ファミリーなし)	1-8

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

17.04.03

国際調査報告の発送日

30.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

加々美 一恵

2 J 9408



電話番号 03-3581-1101 内線 3251